

**Espacenet**

Bibliographic data: DE 19646372 (C1)

Conjugates of polypeptide and encoding nucleic acid

Publication date: 1997-06-19
Inventor(s): PSCHORR JOHANNES DR [DE] +
Applicant(s): EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH [DE] +
Classification:
- **international:** **C12N15/10; C12N15/11;** (IPC1-7): C12N15/10; C12N15/11
- **European:** C12N15/10C8; C12N15/11
Application number: DE19961046372 19961109
Priority number(s): EP19950117787 19951111

Abstract of DE 19646372 (C1)

Compound comprises a structural unit A (genotype) and a further structural unit B (phenotype), in which the genotype and phenotype are permanently linked to each other, where structural unit A exhibits, besides other regions, a region coding for a polymeric molecule constructed from amino acid units and the coding regions are translatable, and furthermore a first structural subunit (terminator) is located in an untranslated section of structural unit A, which permanently links structural unit B as a translation product of structural A to structural unit A.

Last updated: 12.10.2011 Worldwide Database 5.7.23.2; 93p



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 196 46 372 C 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/11
C 12 N 15/10

②① Aktenzeichen: 196 46 372.6-41
②② Anmeldetag: 9. 11. 96
④③ Offenlegungstag: —
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 19. 6. 97

DE 196 46 372 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①
11.11.95 EP 95 11 7787.2

⑦③ Patentinhaber:
EVOTEC BioSystems GmbH, 22529 Hamburg, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln

⑦② Erfinder:
Pschorr, Johannes, Dr., 22087 Hamburg, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
Recherche in CA, BIOSIS, WPIDS;

⑤④ Genotyp und Phänotyp koppelnde Verbindung

⑤⑦ Verbindung aus einer Struktureinheit A (Genotyp) und einer weiteren Struktureinheit B (Phänotyp), bei der Genotyp und Phänotyp dauerhaft miteinander verbunden sind, wobei die Struktureinheit A neben anderen Bereichen mindestens einen für mindestens ein aus Aminosäureeinheiten aufgebautes, polymeres Molekül codierenden Bereich aufweist und der oder die codierenden Bereich(e) translatierbar ist oder sind, weiterhin in der Struktureinheit A eine erste Strukturuntereinheit (Terminator) in einem nicht translatierten Abschnitt angeordnet ist, die die Struktureinheit B als Translationsprodukt der Struktureinheit A mit der Struktureinheit A dauerhaft verbindet.

DE 196 46 372 C 1

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Verbindung aus einer Struktureinheit A (Genotyp) und einer weiteren Struktureinheit B (Phänotyp) gemäß Oberbegriff des Anspruchs 1 sowie ein Verfahren zur molekularen Genotyp/Phänotyp Kopplung durch Herstellung eines Fusionsproduktes gemäß der erfindungsgemäßen Verbindung nach Anspruch 12.

Eine Kopplung von Genotyp und Phänotyp ist insbesondere für die evolutive Biotechnologie wünschenswert, da auf diese Weise nach der Selektion von Polypeptid-Molekülen mit besonderen oder verbesserten Eigenschaften direkt auf deren codierende Sequenz zurückgegriffen werden kann. Es sind Verfahren beschrieben worden, die eine derartige Kopplung ermöglichen. Es handelt sich hierbei in erster Linie um Verfahren, welche die zu selektierenden Moleküle in vivo auf einer Oberfläche präsentieren z. B. auf einer Phagen-Oberfläche (Phage Display) auf einer Bakterienoberfläche (Bacterial Surface Display) oder auch direkt auf molekularer Ebene (Molecular Display). Diese in vivo Verfahren zeichnen sich jedoch durch gravierende Nachteile aus. So ist, z. B. durch Transformation bedingt, die Repertoire-Größe auf etwa 10^8 verschiedene Moleküle beschränkt. Selbst durch ein in vivo Diversifizierungsverfahren ließe sich das verfügbare Repertoire nur auf etwa 10^{12} Moleküle erweitern. Theoretisch möglich wäre jedoch eine Diversität von $> 10^{15}$ Molekülen. Darüber hinaus würden in vivo Systeme die Expression cytotoxischer Gene nicht gestatten. Zudem erlauben derartige Systeme nur wahlweise den direkten Zugriff auf cytoplasmatische oder auf sekretorische Proteine. Diese in vivo Systeme sind zudem mit einem biologischen Sicherheitsrisiko behaftet, das in einigen Ländern die Arbeit mit derartigen Systemen nur eingeschränkt zuläßt.

Darüberhinaus ist ein in vitro Verfahren beschrieben, in dem DNA-Moleküle, welche die Sequenz eines Peptides und die eines Streptavidin-Bindungspeptides enthalten, in vitro transkribiert werden. An die Transkripte wird chemisch ein Streptavidin geknüpft, so daß bei der in vitro Translation die codierende RNA-Matrize mit dem entstandenen Peptid verknüpft wird. Dieses Verfahren besitzt jedoch mehrere Nachteile. So sind die Wechselwirkungen zwischen Streptavidin und dem Streptavidin-Bindungsprotein unter bestimmten Assay-Bedingungen nicht stabil. Zudem können Wechselwirkungen zwischen dem Streptavidin einer mRNA und dem Streptavidin-Bindungsprotein eines nicht von dieser mRNA codierten Fusionsproteins auftreten. Darüber hinaus kann eine Beeinflussung der Faltungsstruktur des zu selektierenden Peptides durch das Streptavidin-Bindungsprotein auftreten.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht darin, ein risikominimiertes Verfahren zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung anzugeben, und ein Konstrukt bereitzustellen, welche die bislang erreichbare Diversität übersteigen, die Expression cytotoxischer Gene und auch gleichermaßen die Selektion sowohl von cytoplasmatischen als auch sekretorischen Proteinen ermöglichen und zudem nicht auf rekombinante Zellen angewiesen sind. Es sollen zudem insbesondere die Nachteile des oben beschriebenen in vitro Verfahrens vermieden werden.

Das der Erfindung zugrundeliegende Problem wird gelöst durch eine Verbindung gemäß Anspruch 1 und ein Verfahren gemäß Anspruch 12 zur molekularen Genotyp/Phänotyp Kopplung.

Die erfindungsgemäße Verbindung besteht aus einer Struktureinheit A (Genotyp) und einer weiteren Struktureinheit B (Phänotyp), bei der Genotyp und Phänotyp dauerhaft miteinander verbunden sind, wobei die Struktureinheit A mindestens einen für mindestens ein aus Aminosäureeinheiten aufgebautes, polymeres Molekül codierenden Bereich aufweist und der oder die codierende(n) Bereich(e) translatierbar ist oder sind, weiterhin in der Struktureinheit A eine erste Strukturuntereinheit (Terminator) in einem nicht translatierten Abschnitt angeordnet ist, die die Struktureinheit B als Translationsprodukt der Struktureinheit A mit der Struktureinheit A dauerhaft verbindet.

Die dauerhafte Verknüpfung der Struktureinheiten A und B kann insbesondere durch Verwendung eines ribosomalen Translationssystems erfolgen.

Erfindungsgemäß bezeichnet der Begriff Terminator eine Strukturuntereinheit, welche die Struktureinheit B als Translationsprodukt der Struktureinheit A mit der Struktureinheit A dauerhaft verknüpft. Als Terminatoren können erfindungsgemäß nucleophile chemische Gruppen, insbesondere organische Aminogruppen, verwendet werden, welche einen Carbonsäureester, insbesondere zwischen einer tRNA und der Struktureinheit B, unter Ausbildung einer dauerhaften, insbesondere kovalenten Bindung zu spalten vermögen. So können zum Beispiel aliphatische, zyklische oder aromatische Verbindungen, mit einer Aminogruppe, natürliche oder nicht natürliche Aminosäuren und Derivate, oder auch Puromycin und Derivate verwendet werden. Bei Verwendung eines ribosomalen Translationssystems enthält der Terminator vorzugsweise zusätzlich eine stabile Molekülgruppe, die die 2'-3'-ortho-Ester-Struktur einer Aminoacyl-tRNA im Komplex mit Elongationsfaktor EF-Tu und GTP imitiert und daher vom Elongationsfaktor gebunden wird.

Die Kopplungsreaktion kann zufällig erfolgen, jedoch ist es erfindungsgemäß vorteilhaft, die Verknüpfung der Struktureinheit A mit der durch Translation entstandenen Struktureinheit B über eine auf der Struktureinheit A angeordnete zweite Strukturuntereinheit wie z. B. ein Terminatorcodon zu steuern.

Bei dem Terminatorcodon kann es sich um zufällige, auch innerhalb eines codierenden Bereiches der Struktureinheit A liegende, bevorzugt jedoch um definierte, am 3'-terminalen Ende des codierenden Bereiches liegende Codons, beispielsweise Nonsense-Codons (UAG, UAA, UGA) oder beliebige Sinn-Codons, bevorzugt jedoch bezüglich des verwendeten Translationssystems seltene Sinn-Codons (z. B. AGA bei Verwendung eines *E. coli* Translationssystems) handeln.

Die ortsspezifische Kopplung an einem definierten Terminatorcodon kann vorzugsweise mittels zweier Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgen:

1. Die ortsspezifische Kopplung kann erfindungsgemäß unter Verwendung eines Sinn-Codons als Terminatorcodon erfolgen, welches nicht stromaufwärts im codierenden Bereich der Struktureinheit A bereits vorhanden ist. Vorzugsweise wird hierfür das seltene AGA-Codon herangezogen, wobei in diesem Fall der Translationsansatz keine für das AGA-Codon spezifische tRNA enthalten sollte. Am AGA-Codon findet erfindungsgemäß der Peptidyltransfer auf den Terminator statt, welcher in diesem Fall nicht mit den entsprechenden tRNA-Molekülen des Translationsgemisches um die Besetzung der Aminoacyl-Bindungsstelle des Ribosoms

soms konkurriert.

2. Die ortsspezifische Kopplung kann erfindungsgemäß auch durch eine Codon-Anticodon-Wechselwirkung erfolgen. Es ist erfindungsgemäß möglich, den Terminator über einen Spacer mit anderen Bereichen der Struktureinheit A zu verknüpfen. Im Falle der ortsspezifischen Kopplung mittels Codon-Anticodon-Wechselwirkung wird ein Spacer mit tRNA-Struktur gewählt, welcher am Terminatorcodon den Transfer der naszierenden Struktureinheit B auf den Terminator vermittelt. Vorzugsweise wird auch hierfür wie oben beschrieben das AGA-Codon herangezogen, so daß das Translationsgemisch entsprechend vorbehandelt werden sollte.

Im allgemeinen können als Spacer erfindungsgemäß beispielsweise natürliche und/oder synthetische Oligomere oder Polymere, wie z. B. beliebige Nukleinsäuresequenzen, eingesetzt werden. Die Verknüpfung des Spacers an weitere Bereiche der Struktureinheit A, wie z. B. das 3'-terminale Nukleotid einer mRNA, kann in beliebiger Weise erfolgen, vorzugsweise jedoch über die 3'-Position des terminalen Nukleotids. Es ist erfindungsgemäß zweckmäßig, diese Verknüpfung sowie weitere mögliche Verknüpfungen innerhalb der Struktureinheit A so zu wählen, daß diese unter Assay-Bedingungen nicht spaltbar sind. Somit wird auch gewährleistet, daß nach dem Transfer der naszierenden Polypeptidkette auf den Terminator ein weiterer Transfer auf eine neue Aminoacyl-tRNA unterbleibt. Derartige Verknüpfungen können sowohl kovalenter Natur sein als auch auf molekularen Wechselwirkungen, z. B. zwischen Streptavidin oder Avidin und Biotin, Nickel-NTA und oligo-Histidin, Protein und Ligand, Antikörper und Antigen, oder auch zwischen zwei hybridisierenden Nukleinsäuren, beruhen. Die Verknüpfung des Terminators mit einem Ribonukleinsäure-Spacer kann beispielsweise über die 2' und/oder 3'-Position erfolgen.

Die erfindungsgemäße Verbindung sowie das erfindungsgemäße Verfahren werden im folgenden beispielhaft anhand von Figuren dargestellt.

Fig. 1: Allgemeines Prinzip der ribosomal katalysierten Kopplung eines Polypeptids an seine eigene mRNA in vitro.

Fig. 2: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch ein aliphatisches Amin.

Fig. 3: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch ein Puromycin-Molekül.

Fig. 4: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine mit Phenylalanin beladene, modifizierte tRNA.

Fig. 5: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine Anthraniloyl-tRNA.

Fig. 6: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine intramolekulare, beladene Nonsense-Suppressor-tRNA.

Fig. 7: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine intramolekulare, mit Puromycin beladene tRNA.

Fig. 8: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine beladene tRNA, deren Aminosäure mit der mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 1 zeigt das allgemeine Prinzip der in vitro Genotyp-Phänotyp Kopplung unter Verwendung eines ribosomalen Translationsystems. An den codierenden, translatierbaren Bereich der Struktureinheit A schließt sich ein Terminatorcodon an, welches über einen Spacer

mit dem Terminator verknüpft ist. Nach Synthese des beschriebenen Konstruktes wird der codierende Bereich in vitro translatiert. Am Terminatorcodon gelangt der Terminator in die Aminoacyl-Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms. Die naszierende Polypeptidkette (Struktureinheit B) wird katalytisch auf den Terminator transferiert. Als Kopplungsprodukt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende über einen Terminator und einen Spacer stabil mit seiner codierenden Nukleinsäure verknüpft ist. Die Stabilität der Kopplung gewährleistet, daß nach Selektion des Polypeptids mit der gewünschten Eigenschaft gleichzeitig der genetische Bauplan zur Verfügung steht. Symbole: A und P, Aminoacyl- bzw. Peptidyl-Bindungsstelle des Ribosoms; x Terminator.

Die Fig. 2 zeigt die Verwendung eines primären Amins als Terminator. Der codierende, translatierbare Bereich der Struktureinheit A ist hier eine mRNA, welche an Stelle eines Stop-Codons ein einziges AGA-Codon enthält, an das sich ein Spacer (hier Ribonukleinsäure) anschließt. Dessen 3'-Ende weist einen 3'-Desoxy-3'-aminoadenosin-Rest auf, der eine aliphatische Aminogruppe trägt. Der Translationsansatz enthält keine für das Arginin-Codon AGA spezifischen tRNA-Moleküle, so daß am AGA-Codon das modifizierte 3'-Ende des Spacers in die Aminoacyl-Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms gelangen und die naszierende Polypeptidkette auf den Terminator übertragen werden kann. Als Kopplungsprodukt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kovalent mit dem Terminator, der Spacer-RNA und mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 3 zeigt die Verwendung eines Puromycin-Moleküls als Terminator. Die mRNA enthält statt eines Stop-Codons ein einziges AGA-Codon, an das sich ein Spacer (hier Ribonukleinsäure) anschließt. Dessen 3'-Ende weist einen über die 5'-OH-Gruppe gekoppelten Puromycin-Rest auf. Der Translationsansatz enthält keine für das Arginin-Codon AGA spezifischen tRNA-Moleküle, so daß am AGA-Codon das modifizierte 3'-Ende des Spacers in die Aminoacyl-Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms gelangen und die naszierende Polypeptidkette auf den Terminator übertragen werden kann. Als Kopplungsprodukt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kovalent mit dem Terminator, der Spacer-RNA und mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 4 beschreibt die Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine mit Phenylalanin beladene, modifizierte tRNA. Die mRNA enthält statt eines Stop-Codons ein einziges AGA-Codon, an das sich eine beliebige Ribonukleinsäuresequenz anschließt. Deren 3'-Ende weist einen 3'-Desoxy-3'-aminoadenosin-Rest auf, der kovalent an die X₄₇-Base einer mit Phenylalanin beladenen, am 3'-Ende modifizierten tRNA gekoppelt ist. Der Translationsansatz enthält keine für das Arginin-Codon AGA spezifischen tRNA-Moleküle, so daß am AGA-Codon das modifizierte 3'-Ende des Spacers in die Aminoacyl-Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms gelangen und so die naszierende Polypeptidkette auf den Terminator übertragen werden kann. Als Kopplungsprodukt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kovalent mit dem Terminator, der Spacer-RNA und mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 5 verdeutlicht die Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine derivatisierte Anthraniloyl-tRNA. Die mRNA enthält statt eines Stop-Codons ein einziges AGA-Codon, an das sich eine beliebige Ribonukleinsäuresequenz an-

schließt. Deren 3'-Ende weist einen 3'-Desoxy-3'-amino-
nadenosin-Rest auf, der kovalent an die X₄₇-Base einer
derivatisierten Anthraniloyl-tRNA gekoppelt ist. Der
Translationsansatz enthält keine für das Arginin-Codon
spezifischen tRNA-Moleküle, so daß am AGA-Codon
das modifizierte 3'-Ende des Spacers in die Aminoacyl-
Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms gelangen
und so die naszierende Polypeptidkette auf den Termina-
tor übertragen werden kann. Als Kopplungsprodukt
entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kova-
lent mit dem Terminator, der Spacer-RNA und
mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 6 verdeutlicht die Kopplung der naszierenden
Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine
intramolekulare, beladene Nonsense-Suppressor-
tRNA. Die mRNA enthält das Stop-Codon UAG, an das
sich ein Spacer (hier Ribonukleinsäure) anschließt. Der
Spacer enthält die Nukleotidsequenz des Vorläufermo-
leküls einer Nonsense-Suppressor-tRNA und bildet eine
entsprechende Tertiärstruktur aus. Das 3'-Ende ist
durch eine stabile Amidbindung mit einer beliebigen
(natürlichen oder unnatürlichen) Aminosäure verknüpft.
Am Nonsense-Codon UAG kann der Spacer, der als
beladene Suppressor-tRNA fungiert, in die Aminoacyl
Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms gelangen
und die naszierende Polypeptidkette auf den Termina-
tor übertragen werden. Als Kopplungsprodukt entsteht
ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kovalent mit
dem Terminator, der Spacer-RNA und mRNA ver-
knüpft ist.

Die Fig. 7 zeigt die Kopplung der naszierenden Poly-
peptidkette an ihre eigene mRNA durch eine intramole-
kulare, mit Puromycin beladene tRNA. Die mRNA ent-
hält statt eines Stop-Codons ein einziges AGA-Codon,
an das sich ein Spacer (hier Ribonukleinsäure) an-
schließt. Der Spacer enthält die Nukleotidsequenz des
Vorläufermoleküls einer für das AGA-Codon spezifi-
schen tRNA und bildet eine entsprechende Tertiär-
struktur aus. Das 3'-terminale Nukleotid des Spacers
(A₇₆) weist einen Puromycin-Rest auf. Der Translations-
ansatz enthält keine für das Arginin-Codon AGA spezi-
fischen tRNA-Moleküle, so daß am AGA-Codon der
Spacer, der als beladene tRNA fungiert, in die Aminoacyl-
Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms ge-
langen und die naszierende Polypeptidkette auf den
Terminator übertragen werden kann. Als Kopplungs-
produkt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen
Ende kovalent mit dem Terminator, der Spacer-RNA
und mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 8 verdeutlicht die Kopplung der naszierenden
Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine
beladene tRNA, deren Aminosäure mit der mRNA ver-
knüpft ist. Die mRNA enthält ein einziges AGA-Codon,
an das sich ein Stop-Codon und ein Spacer (hier Ribonu-
kleinsäure) anschließt. Der Spacer ist am 3'-Ende über
eine Phosphodiesterbindung mit der Seitenkette des
Terminators kovalent verknüpft. Der Terminator wie-
derum ist über eine Aminoacylbindung an eine tRNA
gebunden. Der Translationsansatz enthält keine für das
Arginin-Codon AGA spezifischen tRNA-Moleküle, so
daß am AGA-Codon der mit der mRNA gekoppelte
Terminator in die Aminoacyl-Bindungsstelle des trans-
latierenden Ribosoms gelangen und die naszierende
Polypeptidkette auf den Terminator übertragen werden
kann. Der darauffolgende Transfer des Peptidylrestes
auf Wasser am Stop-Codon bewirkt die Freisetzung der
AGA-spezifischen tRNA. Als Kopplungsprodukt ent-
steht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kova-

lent mit dem Terminator, der Spacer-RNA und mRNA
verknüpft ist. Weder die tRNA noch die Art der Amino-
säure-Verknüpfung ist in dieser Ausführungsform ver-
ändert, so daß eine Bindung durch den Elongationsfak-
tor Tu unter nahezu natürlichen Bedingungen und somit
ein effizienter Einbau des Terminatormoleküls ermög-
licht werden.

Die experimentelle Umsetzung der in Fig. 8 darge-
stellten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Ver-
fahrens kann beispielhaft durch folgende Schritte erfol-
gen:

Vorbereitende Schritte: (Endprodukt einsetzbar für be-
liebige Kopplungsreaktionen)

1. Chemische Aminoacylierung des Diribonukleo-
tids pC₇₅pA₇₆ mit einer Aminosäure, deren Seiten-
kette R mit einem beliebigen Diribonukleotid oder
Didesoxyribonukleotid modifiziert ist [R =
-CH₂-3'-pXpXp-5'];
2. Ligation des aminoacylierten Diribonukleotids
mit einer für das Codon AGA spezifischen tRNA
(C₇₄-Ende!) durch T4-RNA-Ligase;
3. Reinigung der korrekten und funktionalen Liga-
tionsprodukte (Aminoacyl-tRNAs) durch immobili-
sierten Elongationsfaktor EF-TU in Gegenwart
von GTP;

Weitere Schritte: (abhängig von dem zu selektieren-
den Zielmolekül);

4. Diversifizierung des entsprechenden Polypeptid-
Strukturgens durch chemische Resynthese (codon-
based mutagenesis) oder durch Mutagenese- und/
oder Rekombinations-PCR Unter dem Begriff "co-
don-based mutagenesis" wird im Sinne der Erfin-
dung eine chemische Synthese von DNA verstan-
den, bei der statt Monomer-Bausteinen Trimere
eingesetzt werden, die jeweils für eine bestimmte
Aminosäure codieren. Durch Mischen von Trimer-
Bausteinen bei der Synthese kann der Einbau ver-
schiedener Codons im gewünschten Verhältnis an
jeder Position erzielt werden.
Unter dem Begriff "Mutagenese-PCR" wird im Sin-
ne der Erfindung eine in-vitro-Amplifikation von
DNA verstanden, bei der durch bestimmte Bedin-
gungen eine fehlerhafte Verdopplung der DNA er-
zwungen wird.
Unter dem Begriff "Rekombinations-PCR" wird im
Sinne der Erfindung eine in-vitro-Amplifikation
von DNA verstanden, bei der durch Mischen von
zufälligen DNA-Subfragmenten homologer Gene
neue, mosaikartige Gene synthetisiert werden. Die-
ser Prozeß ist mit einer natürlichen Rekombination
vergleichbar;
5. Erneute Amplifikation (Reamplifikation) der syn-
thetisierten Strukturgene durch PCR, wobei der
5'-Primer einen Promotor (z. B. T7-Promotor) und
eine Translationsinitiationsregion (einschließlich
ATG-Start-Codon), während der 3'-Primer sechs
Histidin-Codons, das Terminatorcodon AGA und
das Nonsense-Codon TAG einführt;
6. Präparation einer Spacer-DNA (z. B. chemische
Synthese oder durch PCR), deren 5'-terminale Se-
quenz mit der 3'-terminalen Sequenz des reampli-
fizierten Strukturgens überlappt;
7. Verspleißen beider DNA-Fragmente durch SOE-
PCR (splicing by overlap extension), wobei der
Spacer den 3'-terminalen Fusionspartner bildet.

Unter dem Begriff "SOE-PCR" wird im Sinne der Erfindung eine in-vitro-Amplifikation von DNA verstanden, bei der aufgrund überlappender Bereiche zwei DNA-Fragmente miteinander verspleißt werden;

8. In-vitro-Transkription des Fusionsgens mit m⁷GpppG (5'-Cap-Struktur) als Primer (z. B. mit T7-DNA-Polymerase);
9. Reinigung des run-off-Transkriptes durch Polyacrylamidgelelektrophorese;
10. Ligation der synthetisierten RNA (freies 3'-OH-Ende; 5'-Ende durch Cap-Struktur geschützt) mit der Aminosäure-Seitenkette der aminoacylierten tRNA durch T4-RNA-Ligase;
11. Reinigung des Produktes durch Polyacrylamidgelelektrophorese;
12. In-vitro-Translation der mRNA und Kopplung der naszierenden Polypeptidkette durch die für das AGA-Codon spezifische, aminoacylierte tRNA in Gegenwart eines E. coli Translationsgemisches, das durch entsprechende Vorbehandlung keine für das Arginin-Codon AGA spezifische tRNA-Moleküle mehr enthält;
13. Abtrennung der Translationsfaktoren und Reinigung der Fusionsmoleküle durch Affinitätschromatographie an einer Nickel-NTA-Matrix. Unter dem Begriff "Nickel-NTA-Matrix" wird im Sinne der Erfindung eine Matrix verstanden, die aufgrund eines immobilisierten Nickelions die Reinigung von Oligohistidinhaltigen Biomolekülen ermöglicht;
14. In-vitro-Selektion von Fusionsmolekülen mit gewünschten Eigenschaften (z. B. durch Panning);
15. Reverse Transkription der angereicherten Fusionsmoleküle und Reamplifikation der genetischen Information durch PCR, wobei der 5'-Primer wiederum den Promoter und die Translationsinitiationsregion einführt, während der 3'-Primer mit der 3'-terminalen Sequenz des Spacers hybridisiert;
16. Wiederholung des beschriebenen Verfahrens ab Schritt 8.

Die experimentelle Umsetzung des ersten vorbereitenden Schrittes kann insbesondere auch unter Verwendung einer Aminosäure, deren Seitenkette mit einem beliebigen Oligoribonukleotid oder Oligodesoxyribonukleotid modifiziert ist, erfolgen.

Weiterhin kann es bevorzugt sein, wenn die Seitenkette der Aminosäure ein freies 5'-OH-Ende aufweist, welches erst nach Ligation gemäß Schritt 2 5'-phosphoryliert wird. In vorteilhafter Weise läßt sich somit die Ausbeute von funktionalen Ligationsprodukten erhöhen.

In Anlehnung an Fig. 8 befindet sich in einer weiteren Ausführungsform mindestens ein Sinn-Codon zwischen Terminatorcodon und Stop-Codon. Auf diese Weise wird eine Kopplung zwischen Terminator und Polypeptidkette nicht mehr auf deren C-terminale Aminosäure beschränkt.

Patentansprüche

1. Verbindung aus einer Struktureinheit A (Genotyp) und einer weiteren Struktureinheit B (Phänotyp), bei der Genotyp und Phänotyp dauerhaft miteinander verbunden sind, wobei die Struktureinheit A neben anderen Bereichen mindestens einen für mindestens ein aus Aminosäureeinheiten aufgebaut-

tes, polymeres Molekül codierenden Bereich aufweist und der oder die codierenden Bereich(e) translatierbar ist oder sind, weiterhin in der Struktureinheit A eine erste Strukturuntereinheit (Terminator) in einem nicht translatierten Abschnitt angeordnet ist, die die Struktureinheit B als Translationsprodukt der Struktureinheit A mit der Struktureinheit A dauerhaft verbindet.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die Verknüpfung der Struktureinheit A mit der durch Translation entstandenen Struktureinheit B über eine auf der Struktureinheit A angeordnete zweite Strukturuntereinheit gesteuert wird.

3. Verbindung nach Anspruch 2, wobei die zweite Strukturuntereinheit ein Codon (Terminator-Codon) ist.

4. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Struktureinheit A eine modifizierte mRNA ist und die Struktureinheit B eine aus der mRNA translatierte Polypeptidkette ist.

5. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Terminator über einen Spacer mit anderen Bereichen der Struktureinheit A verknüpft ist.

6. Verbindung nach Anspruch 5, wobei der Spacer mit dem Terminatorcodon der Struktureinheit A in Wechselwirkung tritt.

7. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Terminator eine nucleophile chemische Gruppe ist, die einen Carbonsäureester unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zu spalten vermag.

8. Verbindung nach Anspruch 7, wobei die nucleophile chemische Gruppe eine organische Aminogruppe ist.

9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Terminator einen Carbonsäureester zwischen einer tRNA und der Struktureinheit B spaltet und eine dauerhafte Verbindung zwischen den Struktureinheiten A und B ausgebildet wird.

10. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Verknüpfung zwischen den Struktureinheiten A und B durch eine kovalente Verbindung erfolgt.

11. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der Terminator, insbesondere als nucleophile Gruppe über eine Bindung an einen Spacer mit tRNA Struktur gebunden ist, der mit dem Terminatorcodon der Struktureinheit A, die insbesondere eine mRNA ist, in Wechselwirkung treten kann.

12. Verfahren zur molekularen Genotyp/Phänotyp Kopplung mittels einer Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit A mit einem Translationssystem umgesetzt wird in Gegenwart von zur Translation benötigten Substanzen.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die gekoppelten Genotypen/Phänotypen isoliert werden.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

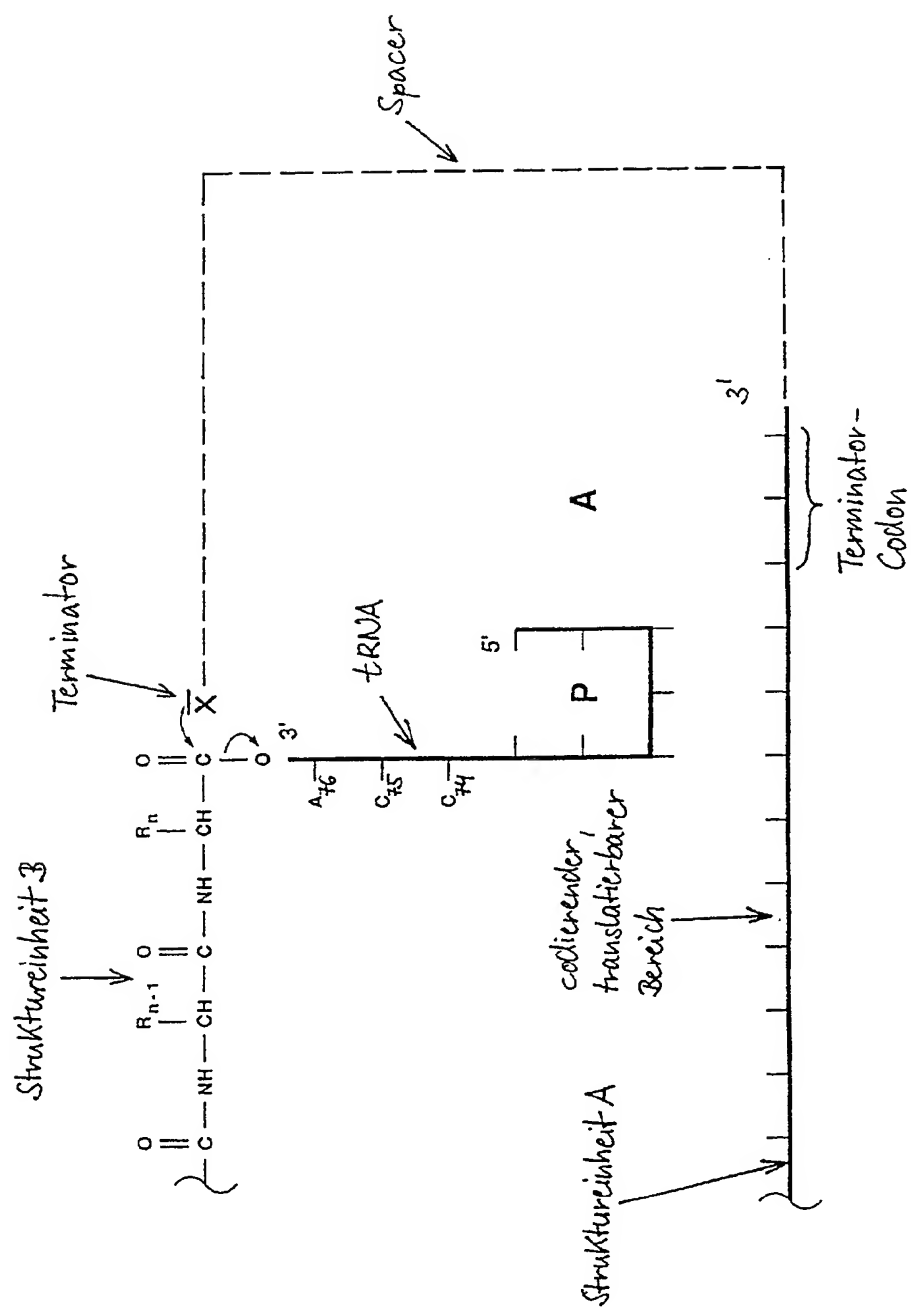


Fig. 1

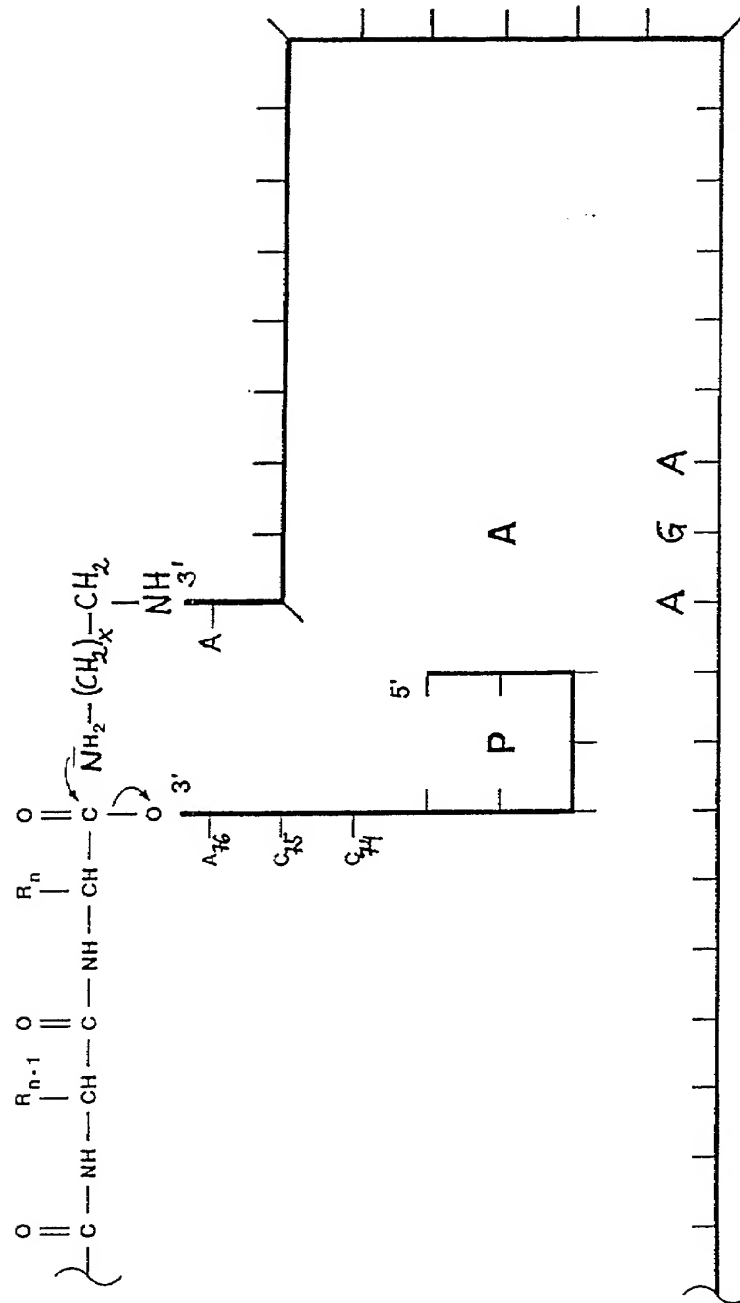


Fig. 2

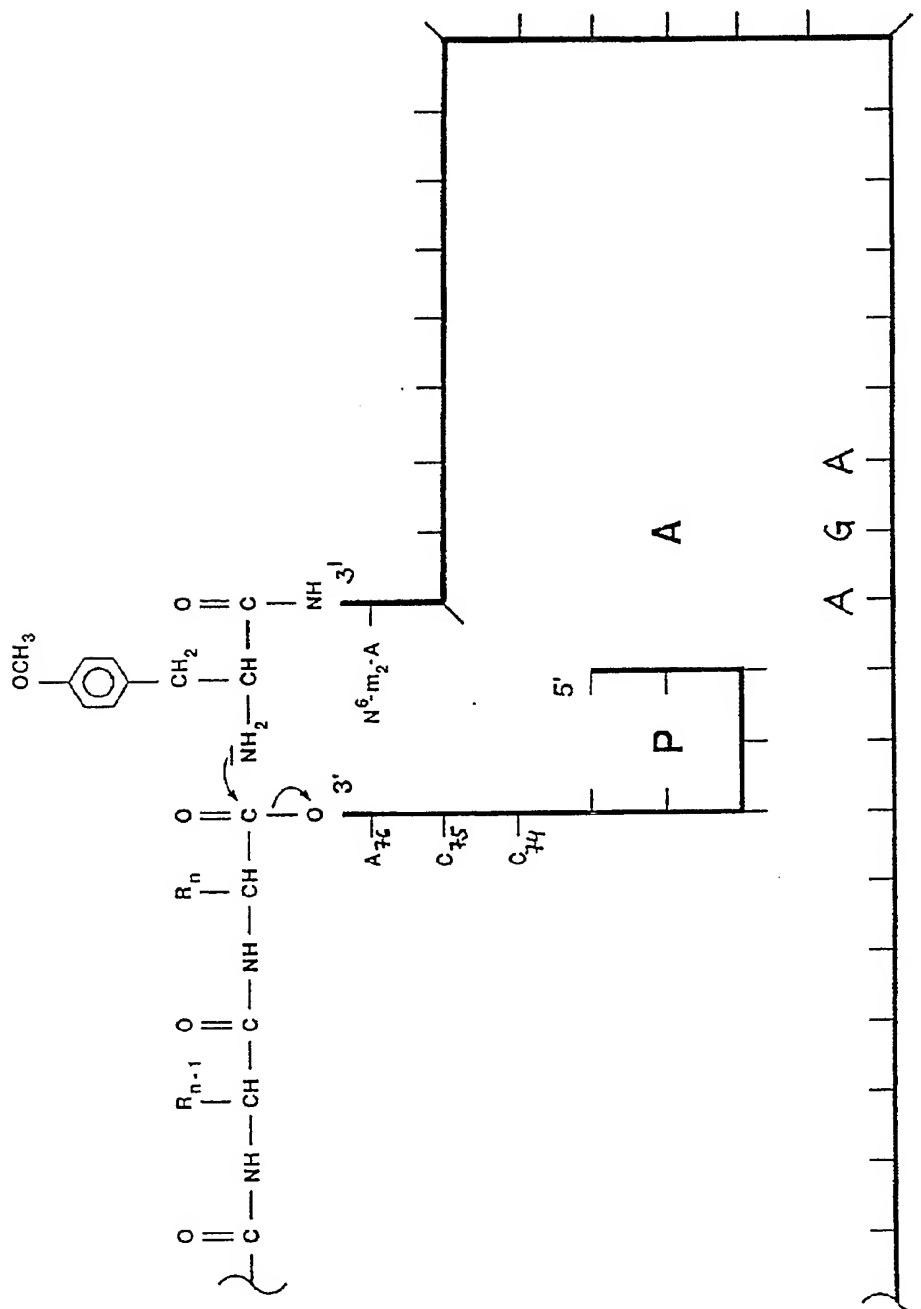


Fig. 3

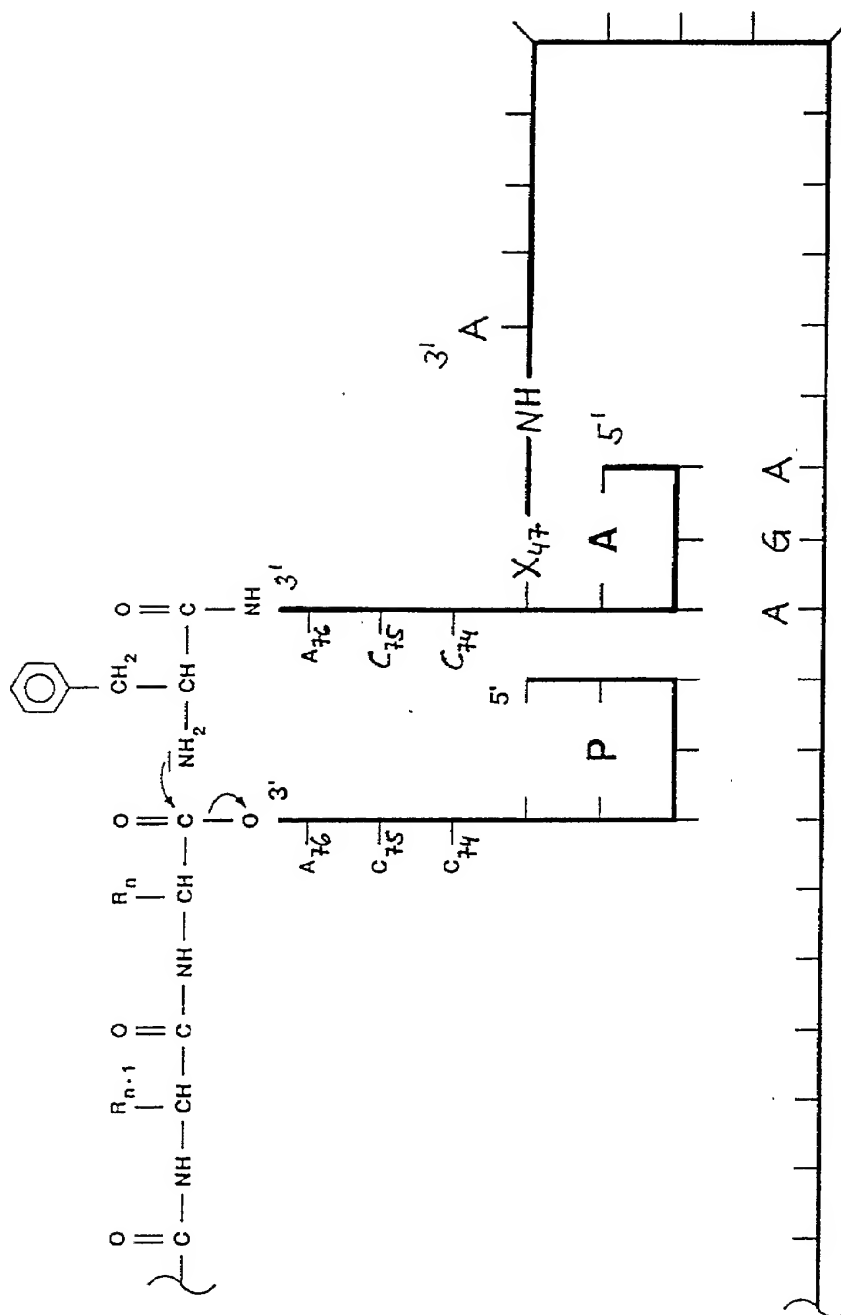


Fig. 4

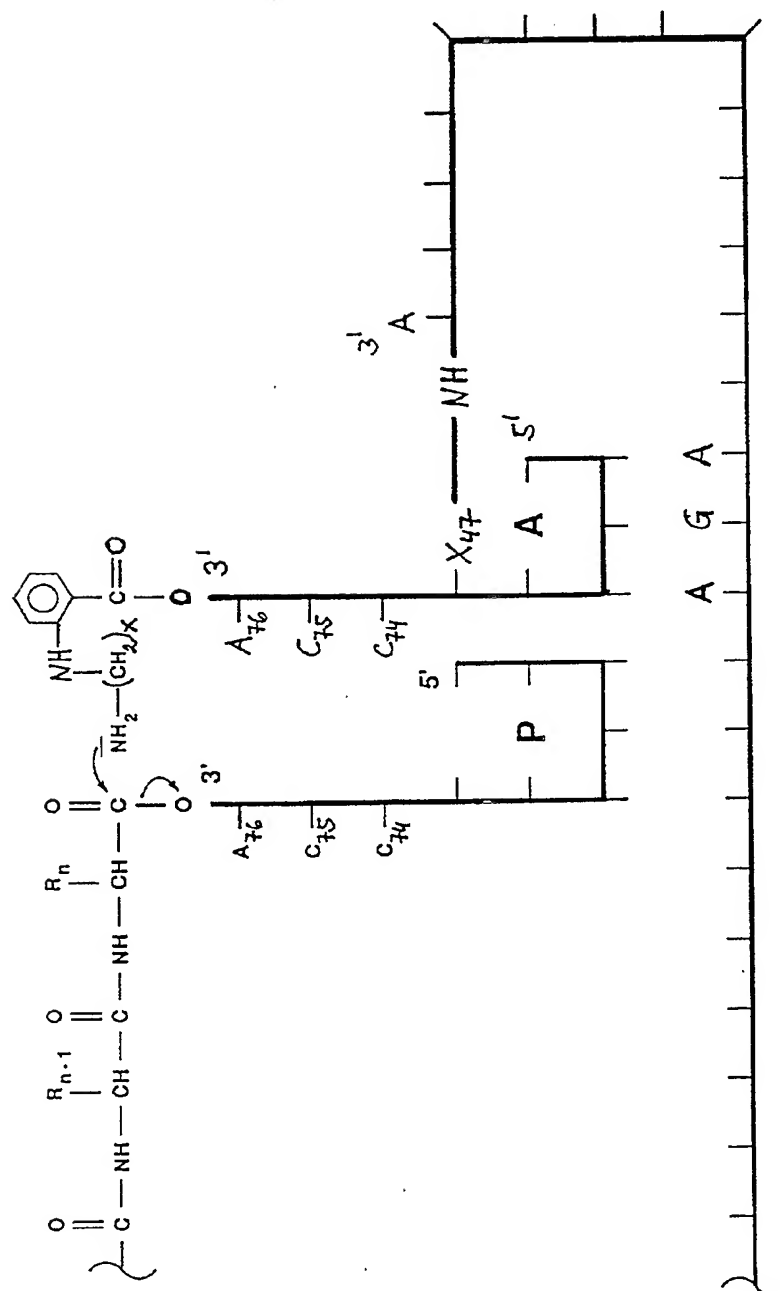


Fig. 5

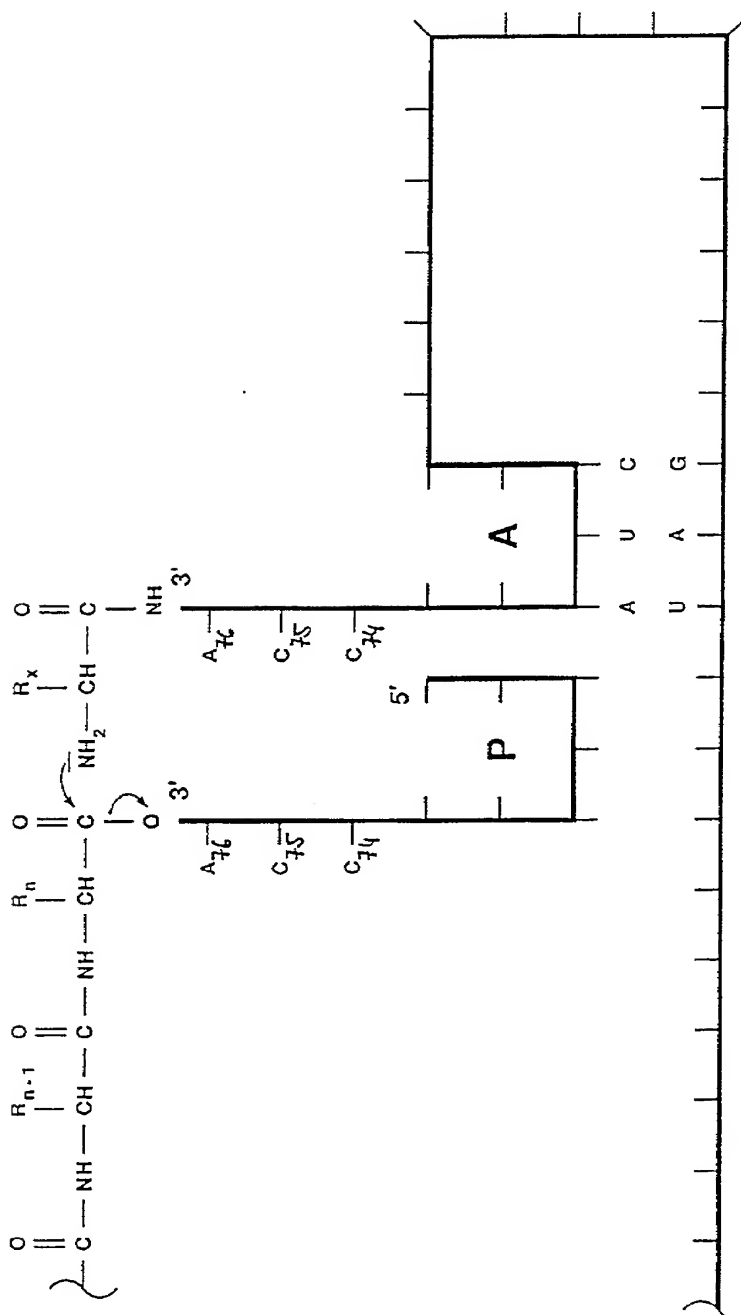


Fig. 6

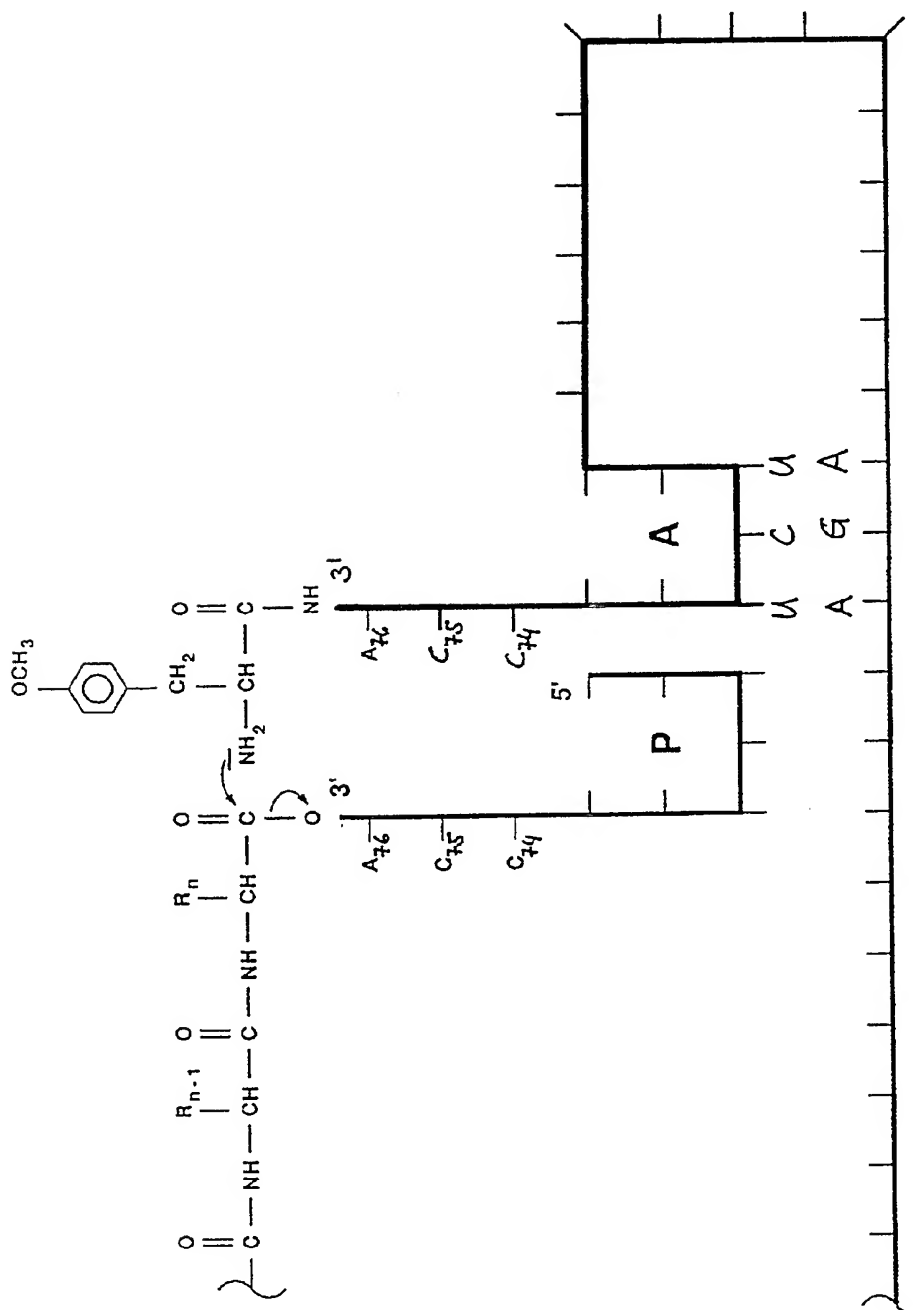


Fig. 7

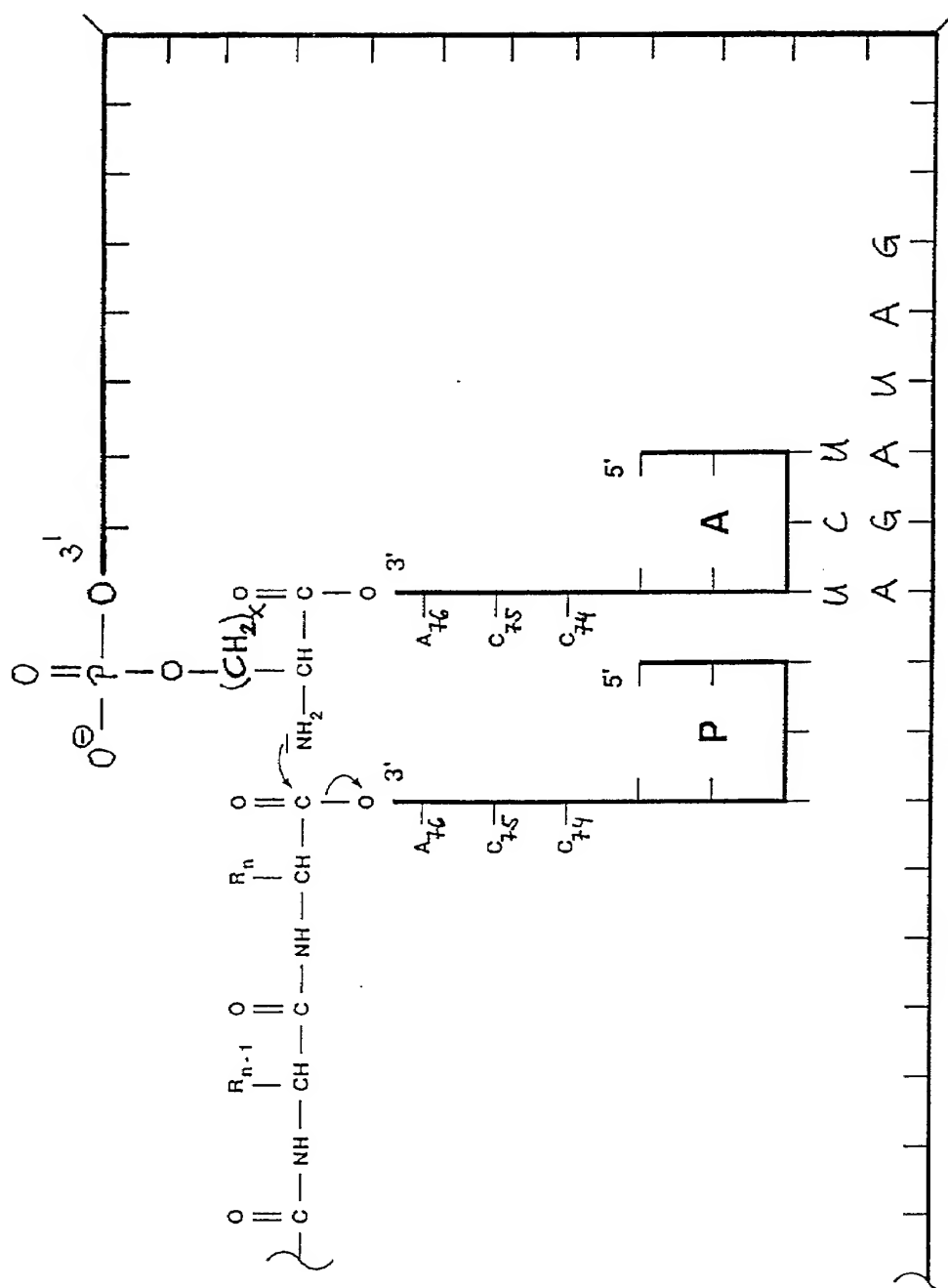


Fig. 8